

Pierre J. Silvie

Position actuelle

Chargé de recherche IRD, basé à
Montpellier
mis à disposition du CIRAD (depuis 1985)

Expérience

Lutte intégrée contre les ravageurs du
cotonnier (Tchad -1984-, Togo, Bénin,
Paraguay, Brésil -retour France 2009)

Formation initiale

Doctorat en entomologie, spécialité agricole
(Paris XI, 1983)



Institut de recherche
pour le développement

Comment créer une plante transgénique ?

Pierre J. SILVIE

A partir du matériel didactique de
Dr. Catherine Pannetier, CIRAD,
Versailles, France

+ photos D. Mieulet (riz)

Les défis à surmonter

1. Faire pénétrer l'ADN dans la cellule végétale : les **méthodes de transfert**
2. Exprimer le gène nouvellement introduit : les **constructions**
3. Trier les tissus transformés : le problème des **gènes marqueurs**
4. Obtenir une plante transgénique exprimant le gène introduit : la **régénération** à partir de la (des) cellule(s) transformées

4 méthodes

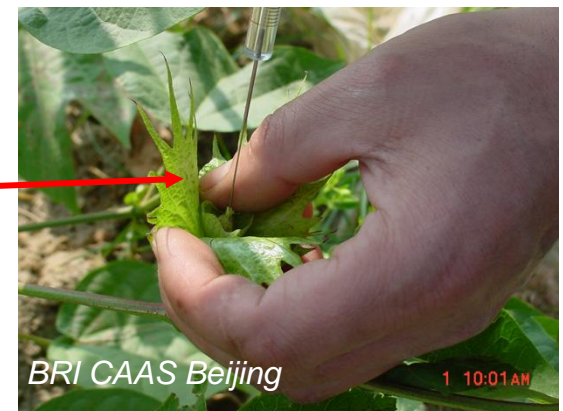
- *Agrobacterium tumefaciens* (Cotonnier)
- Biolistique (Riz)
- Protoplaste
- Tube pollinique (Cotonnier)

Les méthodes de transfert de gènes (chloroplaste- injection)

- Electroporation : Choc électrique pour transfert ADN dans des protoplastes



- Injection d'ADN dans les fleurs (cotonnier)



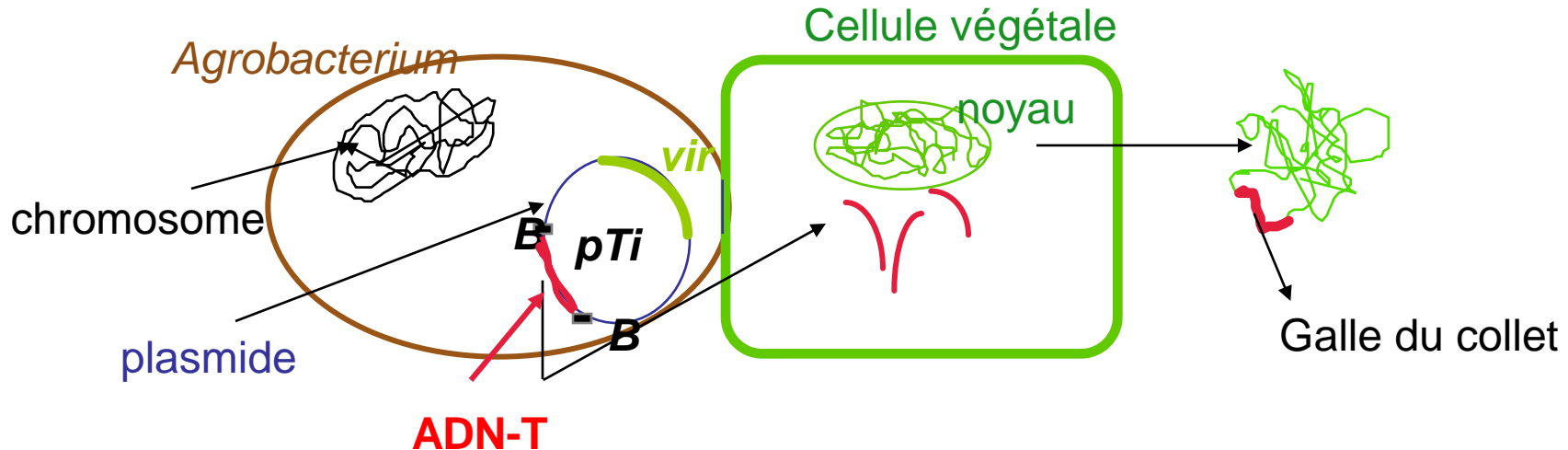
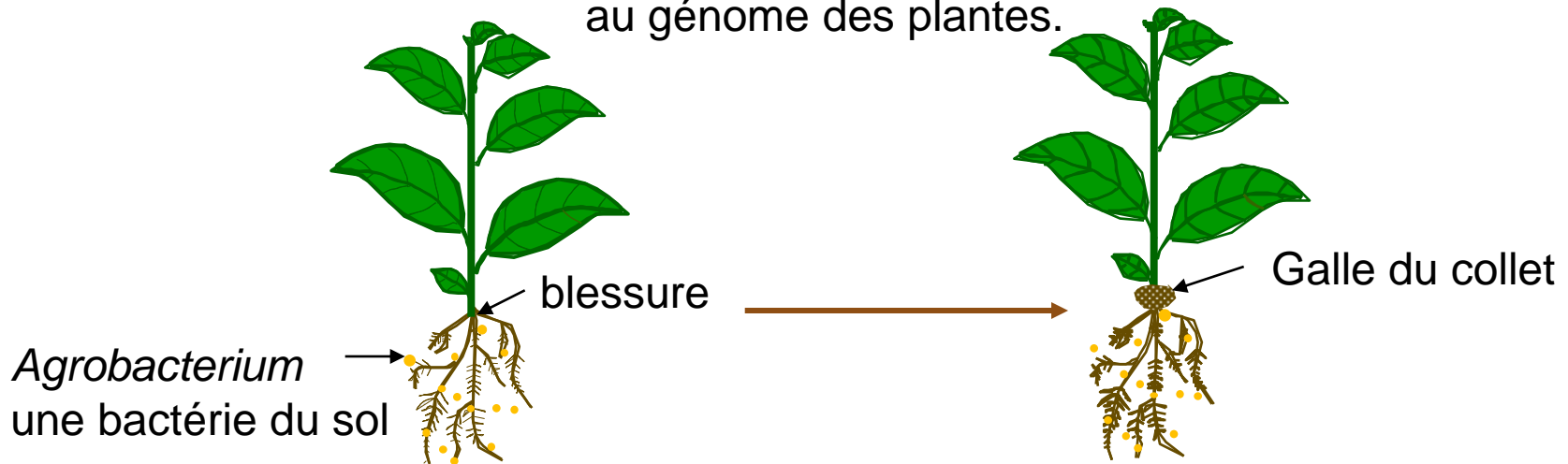


BRI CAAS Beijing (CHINE)

Les méthodes de transfert de gènes: *Agrobacterium*

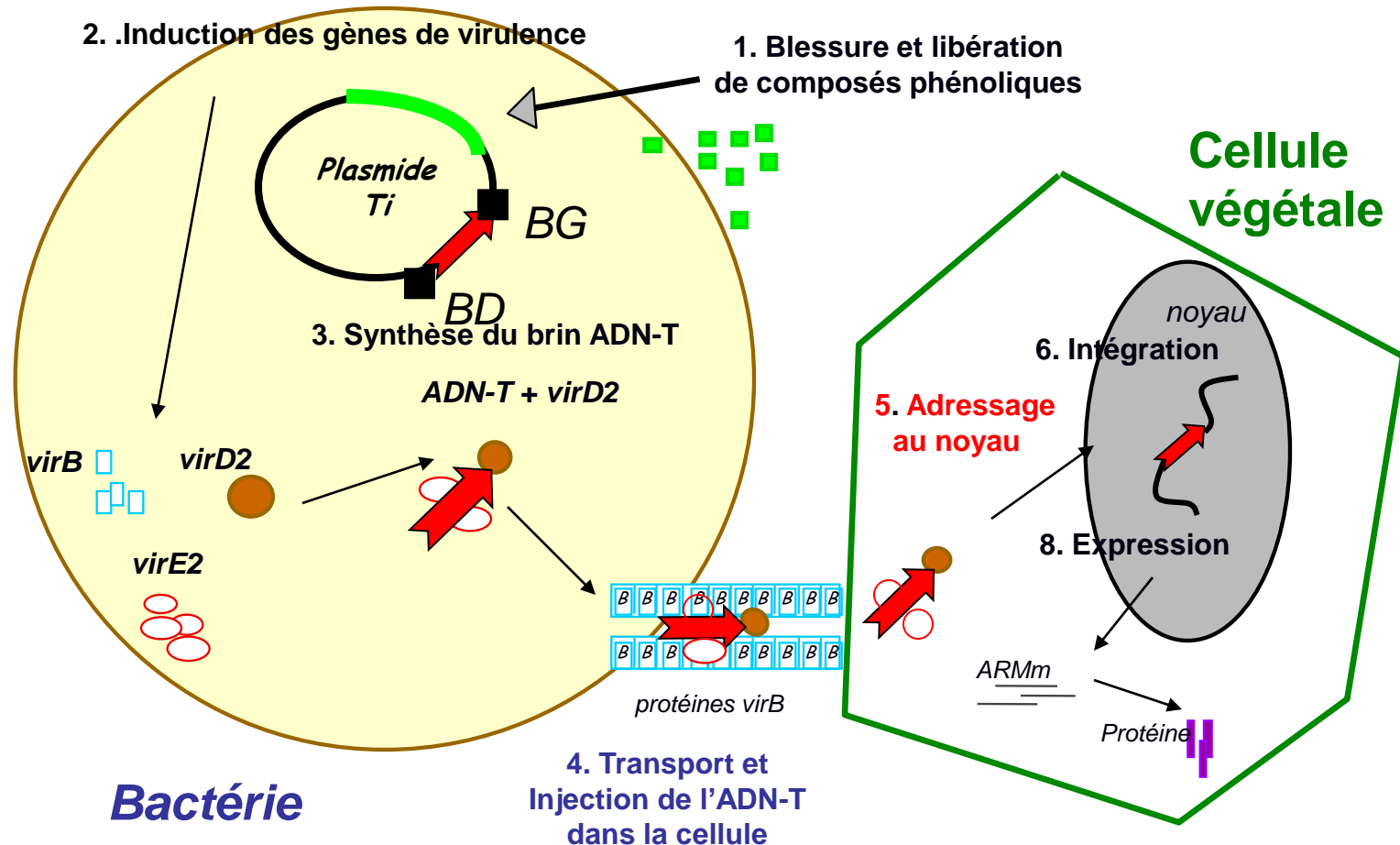
Agrobacterium tumefaciens : une bactérie qui fait du génie génétique

On utilise la propriété de la bactérie de transférer de l'ADN au génome des plantes.



Les méthodes de transfert de gènes: *Agrobacterium*

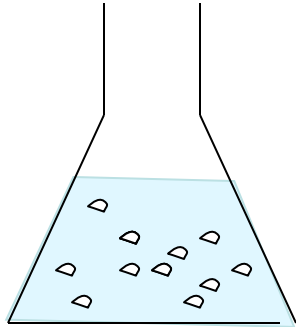
Agrobacterium tumefaciens transfère un fragment **d'ADN précis délimité** par deux séquences bordures de 25bp (BD et BG) dans le noyau de la cellule végétale



Les méthodes de transfert de gènes: *Agrobacterium*

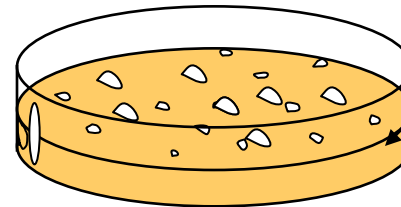
Agrobacterium tumefaciens

Le procédé



Inoculation :

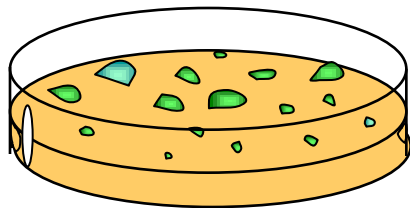
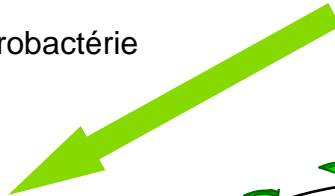
Explants dans suspension d'Agrobactérie



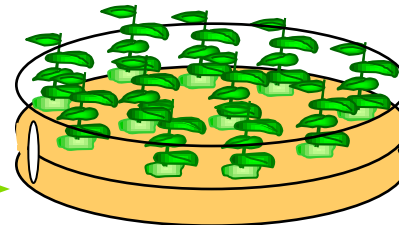
Milieu de culture
pour prolifération
des cellules
végétales

Co culture :

Développement conjoint des cellules
végétales et de la bactérie

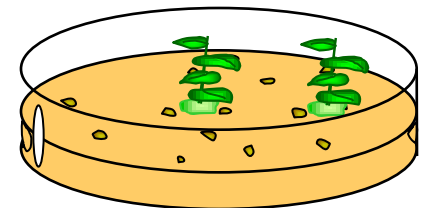


Milieu de culture
+ antibiotique pour éliminer
la bactérie



Différenciation de bourgeons

Sans sélection des
cellules transformées



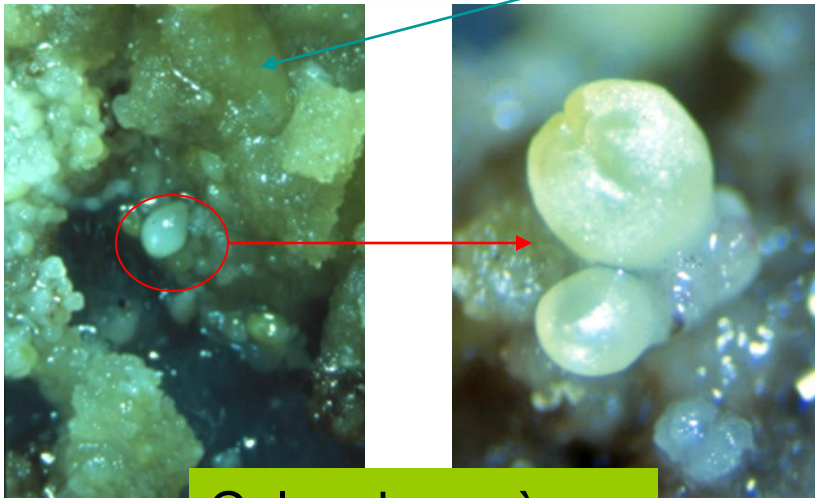
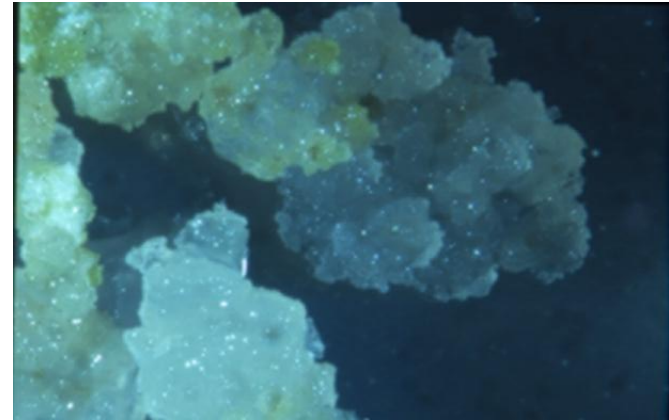
Avec sélection des
cellules transformées

Exemple du cotonnier

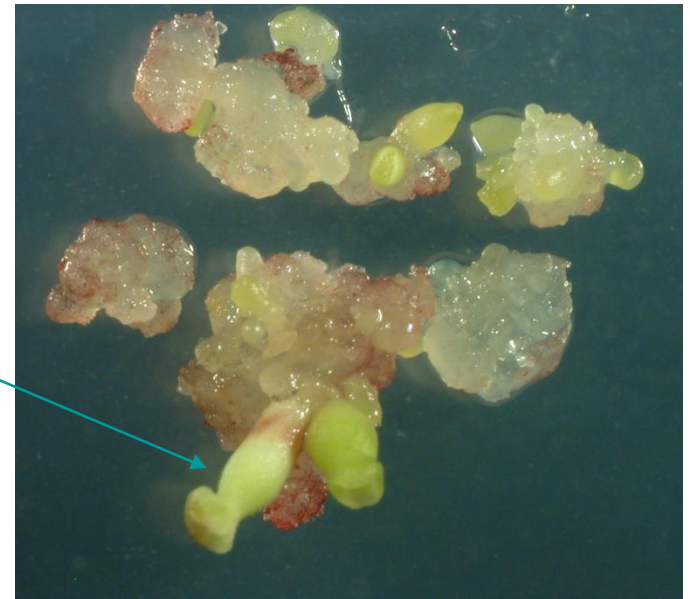
De l'explant aux embryons somatiques

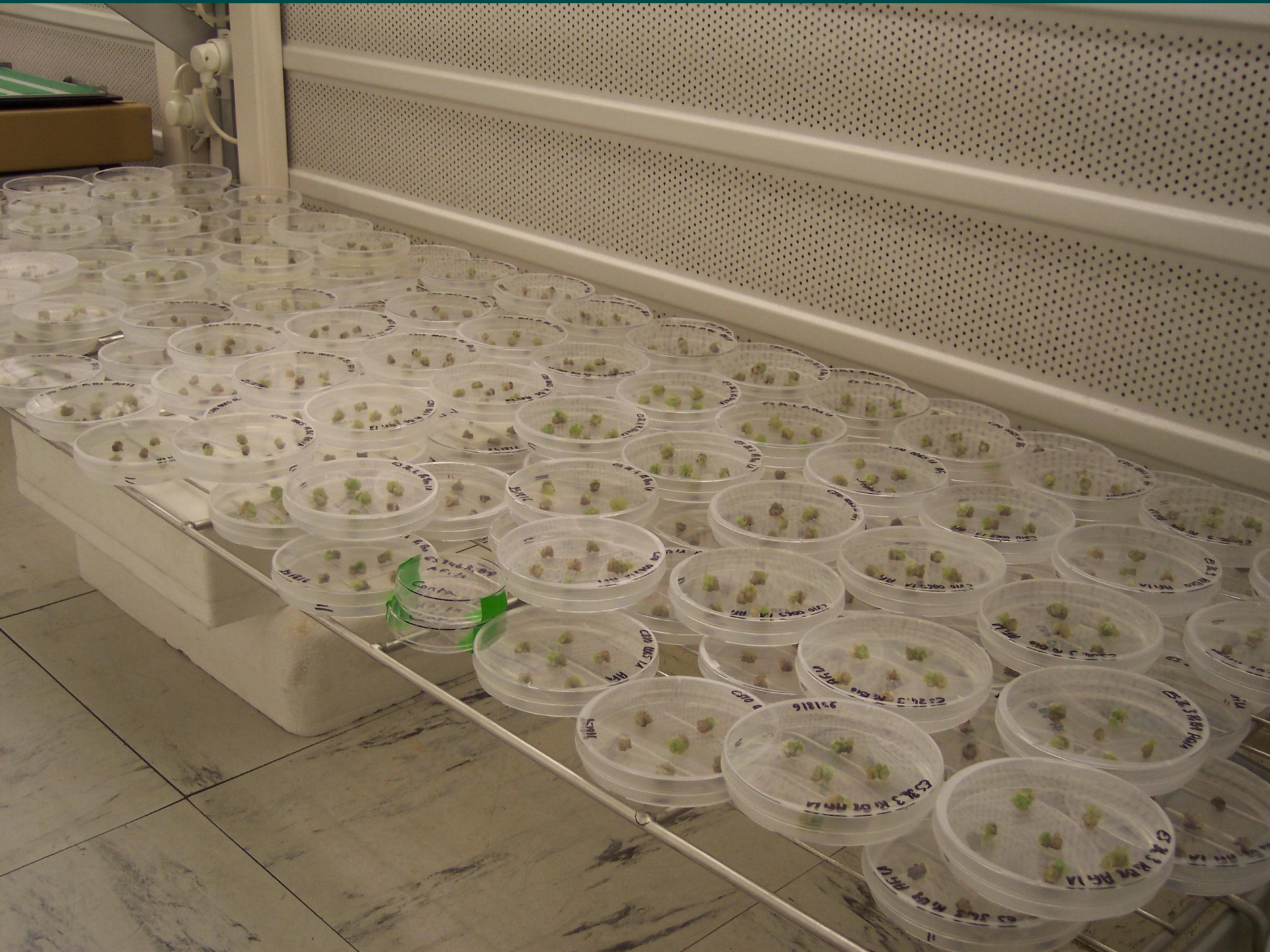


Fragment d'hypocotyle avec cal (transformé) indifférencié



Cal embryogène





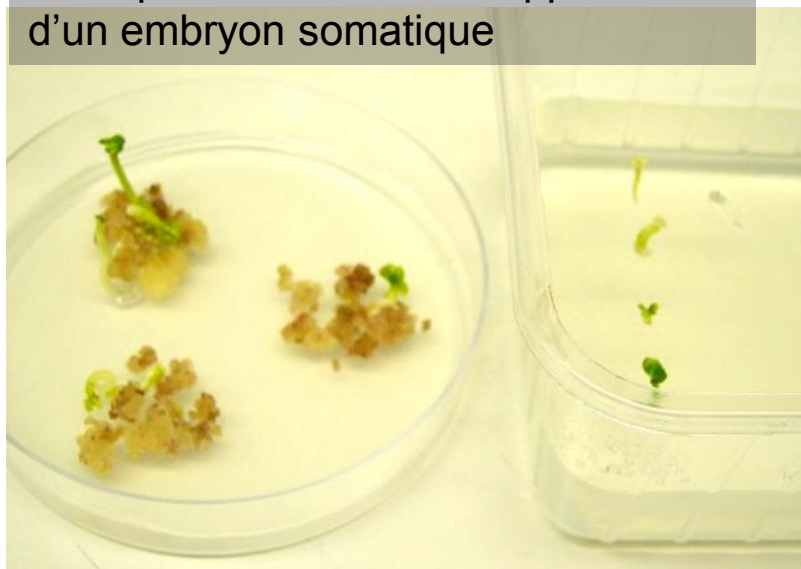


Exemple du cotonnier

De l'embryon au vitro-plant



Plant provenant du développement d'un embryon somatique



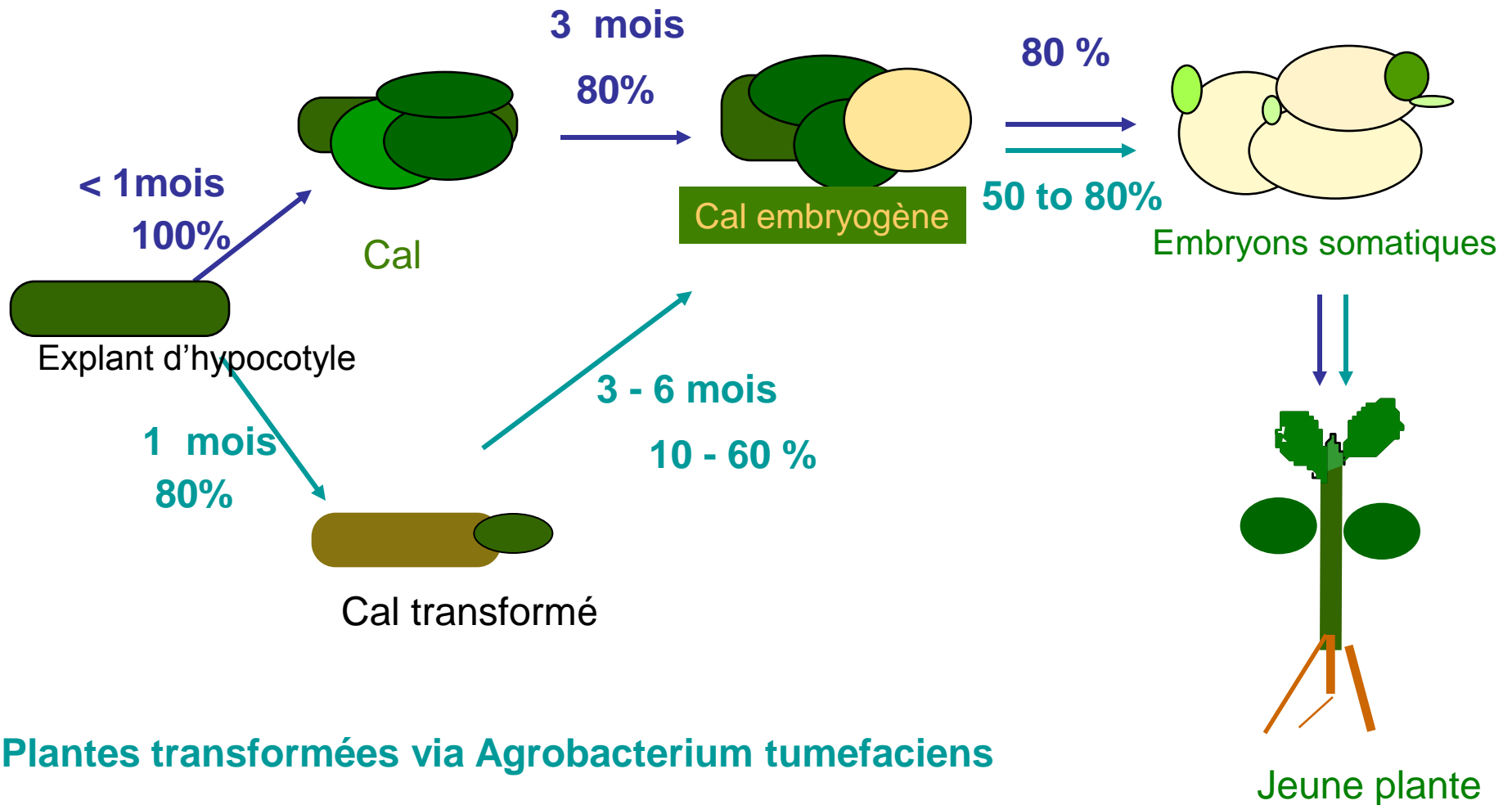
Exemple du cotonnier

Du vitro-plant à la graine



Limitations de la méthode

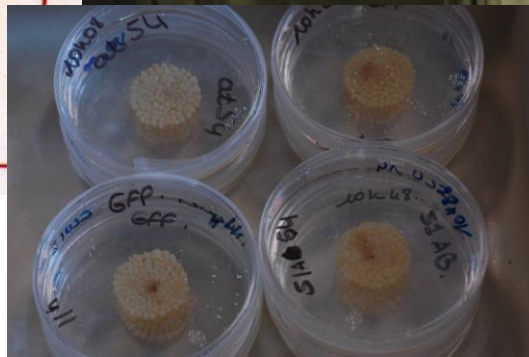
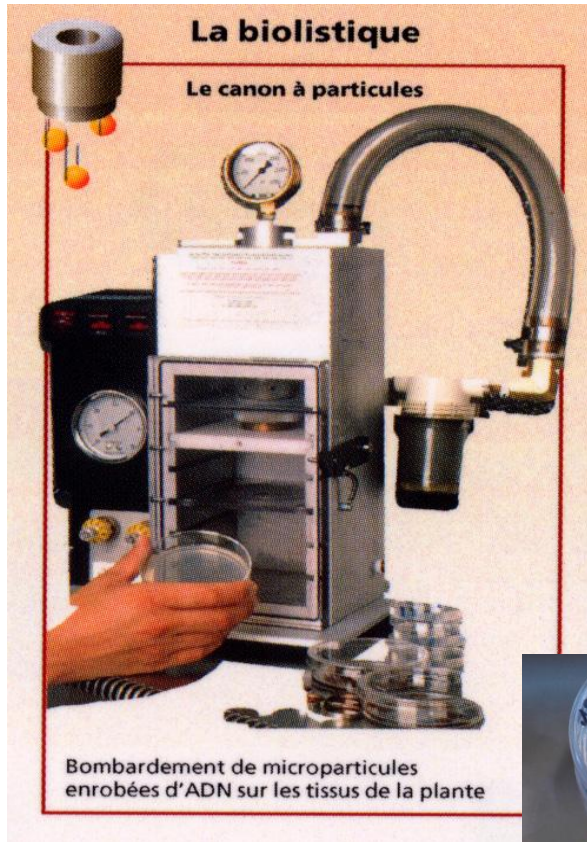
Régénération par embryogenèse somatique



Plantes transformées via *Agrobacterium tumefaciens*

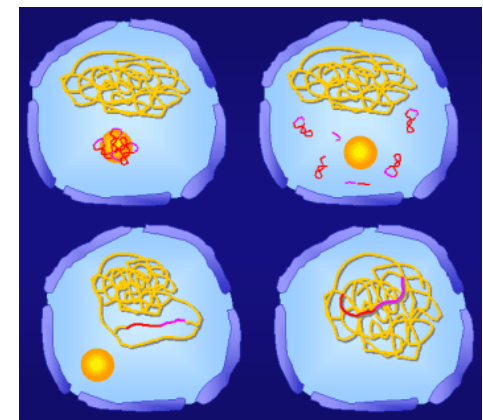
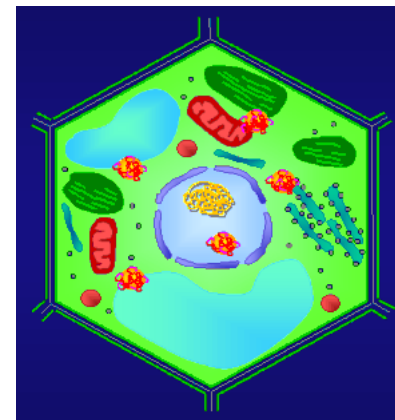
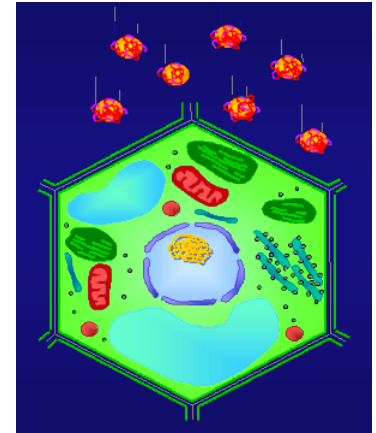
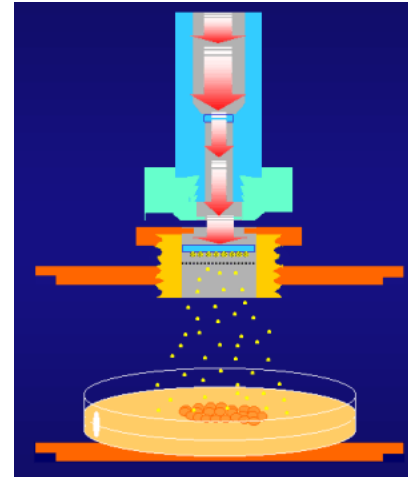
Les méthodes de transfert de gènes: biolistique

Biolistique : Injection par bombardement de particules



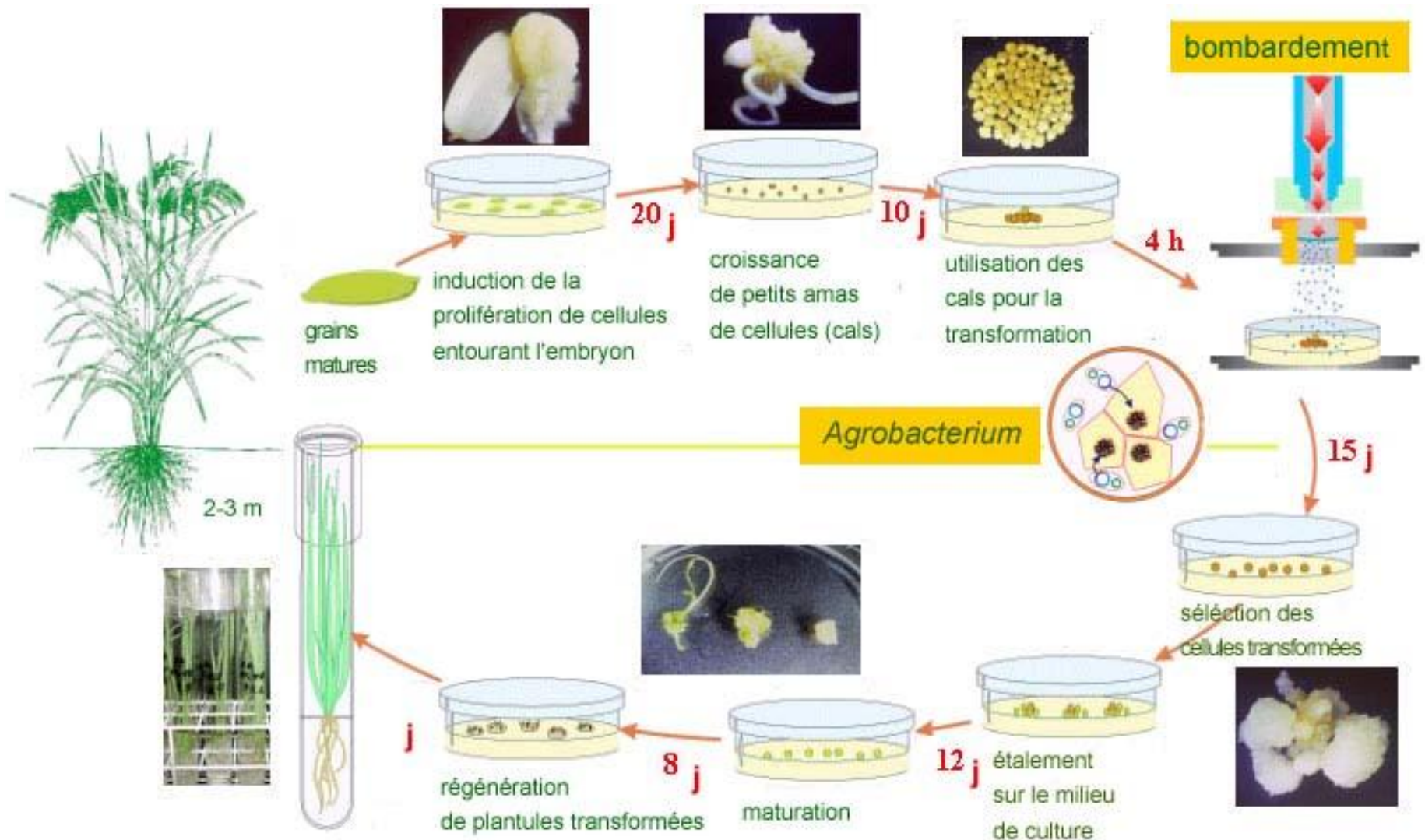
Les méthodes de transfert de gènes: biolistique

- forcer la pénétration de l'ADN à travers la paroi pectocellulosique des cellules végétales
- Envoi à très haute vitesse de billes d'or ou de tungstène enrobées d'ADN (canon à poudre ou à hélium)
- Possibilités de bombarder des organes: apex, embryons (pb chimères)
- Pas d'intégration d'un fragment bien délimité d'ADN
- Souvent très nombreuses copies du gène
- Délicate à mettre au point mais existe chez coton, soja, céréales...



Source F Casse - JC Breitler

Exemple du riz (ou hévéa, au Cirad)



Les étapes d'un programme de transgénèse

- Identification du gène d'intérêt (gène candidat)
- Utilisation d'une méthode de transformation efficace selon la plante ciblée
- Sélection d'un grand nombre de lignées transformées
- Caractérisation de ces lignées
 - présence du gène (PCR)
 - nombre de copies (hybridation Southern)
 - niveau d'expression - ARN (northern, RT-PCR)
 - présence de la protéine (analyses biochimiques - western)
 - physiologie: impact potentiel sur le phénotype
- Identification de la lignée d'intérêt: une copie, fort niveau d'expression, pas de phénotype indésirable.
- Essais au champ

Gènes candidats pour la **résistance aux insectes**

- Les gènes de la bactérie *Bacillus thuringiensis*
 - Protéines CRY (pendant la phase de sporulation):
 - lépidoptères
 - coléoptères
 - Protéines Vip (phase végétative)
- Gènes d'inhibiteurs de protéases (origine plantes)
 - Bloquent les protéases digestives de l'insecte (problème contournement)
- Gènes de chitinases (origine insectes)
 - Action sur la mue
- Gène d'avidine de blanc d'oeuf
 - forte affinité pour la biotine
- Gènes de cholestérol oxydase
 - Toxicité sur *Anthonomus grandis*
 - Exprimé *in planta* - Problème d'interférence sur le développement de la plante
- Gènes de lectines
 - Action sur les sucres - *in planta* un certain effet sur les homoptères

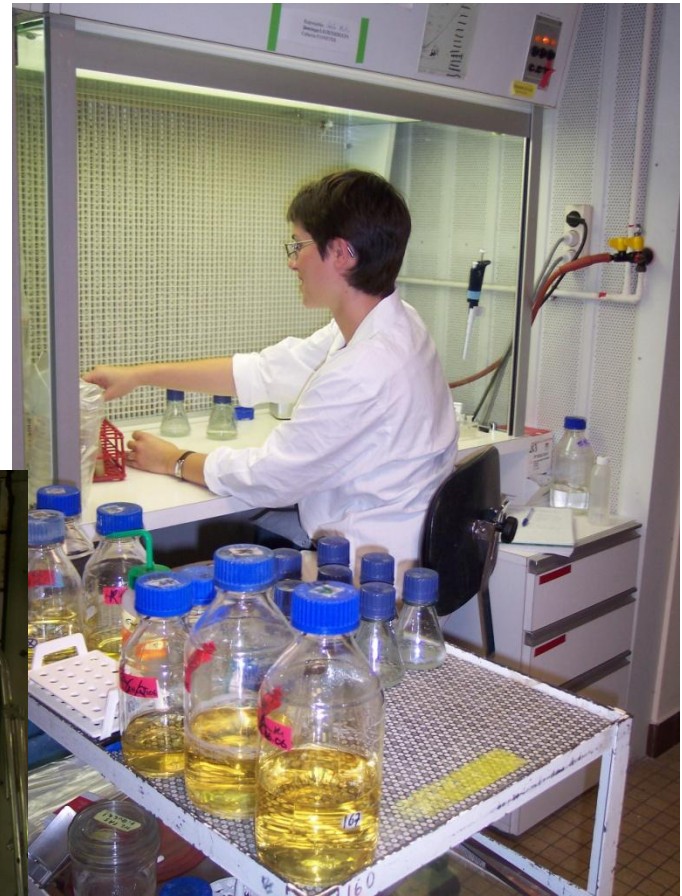


En résumé, il faut: un laboratoire pour culture de tissus...



(Source: INRA, Versailles)

...de l'espace et du matériel...



(Source: INRA, Versailles)

..et des ressources humaines qualifiées !

